

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭64-66213

⑬ Int.Cl.⁴

C 08 F 8/34
8/08
20/00

識別記号

MHQ
MGD

庁内整理番号

7311-4J
7311-4J

⑭ 公開 昭和64年(1989)3月13日

審査請求 未請求 請求項の数 11 (全5頁)

⑮ 発明の名称 チオール基を含有するポリマーおよびその製法

⑯ 特 願 昭63-194740

⑰ 出 願 昭63(1988)8月5日

優先権主張 ⑱ 1987年8月8日 ⑲ 西ドイツ(DE) ⑳ P37 26 454.0

㉑ 発 明 者 ヴェルナー・シュテューバー ドイツ連邦共和国デー-3551 ラーンタール、ケルバーヴェーク12

㉒ 発 明 者 ハルトムート・レーベルマン ドイツ連邦共和国デー-7801 シヤルシュタット、モースヴァルトシュトラッセ7ベアー

㉓ 出 願 人 ベーリングヴェルケ・アクチエンゲゼルシャフト ドイツ連邦共和国マルブルク/ラーン(番地なし)

㉔ 代 理 人 弁理士 高木 千嘉 外2名

明 細 書

1. 発明の名称 チオール基を含有するポリマー
およびその製法

2. 特許請求の範囲

1) ヒドロキシル基を含有する水不溶性ポリマー中にオキシラン基を導入しそしてオキシラン基を含有するポリマーを硫化水素の水溶性塩で処理することにより得られるチオール基含有ポリマー。

2) ヒドロキシル基を含有するポリマーが炭水化物に基づくポリマーであるか、またはメタクリルアミド、N-メチレン-ビス-メタクリルアミド、グリシジルメタクリレート/ポリエチレングリコール誘導体またはペンタエリトリールジメタクリレートに基づくポリマーである請求項1記載のポリマー。

3) ヒドロキシル基を含有するポリマーがアガロースゲルであることからなる請求項1記載

のポリマー。

4) 硫化水素の塩がアルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩である請求項1記載のポリマー。

5) オキシラン基を含有するポリマーがアクリルまたはメタクリル酸誘導体を含有する請求項1記載のポリマー。

6) ヒドロキシル基を含有する水不溶性ポリマーが、ペンタエリトリール、メタクリル酸誘導体およびポリエチレングリコールからなりかつジビニルベンゼンで架橋された共重合体であり、オキシラン基がこの共重合体をエピクロロヒドロリンと反応させることにより導入され、そして硫化ナトリウムで処理される請求項1記載のポリマー。

7) ヒドロキシル基を含有する水不溶性ポリマーがメタクリル酸誘導体(Sepabeads®)に基づくポリマーであり、オキシラン基がこのポ

リマーをブタンジオールジグリシジルエーテルと反応させることにより導入され、そして硫化ナトリウムで処理される請求項1記載のポリマー。

8) ヒドロキシル基を含有する水不溶性ポリマーを40~50℃で1-クロロ-2,3-エポキシプロパン(エピクロロヒドリン)または1,4-ビス-(2,3-エポキシプロポキシ)-ブタンと1~4時間反応させて、それによりオキシラン基をポリマー中に導入させ、ポリマーを水洗し、水溶液中にとり、0~70℃で2~48時間水溶性硫化物で処理しそしてポリマーを水または希酸で洗淨することからなるチオール基含有ポリマーの製法。

9) 酵素、プロ酵素、抗体または抗原の固定への、およびメルカプト基と相互作用する物質のクロマトグラフィーへの請求項1記載のポリマーの使用。

値する。すでに知られており従って従来法に相当するものは、ホモシステインチオラク톤を用いるポリマー誘導体形成、予めブロムシアンで活性化されたグルタチオンとの結合ならびにエピクロロヒドリンでの活性化および続く還元を伴うチオ硫酸塩との反応、のみならずジチオトレイトールとオキシラン基との反応である(R. Axén 氏他、Acta Chemica Scan. B 29, 471~474(1975))。

しかしながらこれらチオール含有ポリマーならびにそれらの製法には欠点があって、それゆえ改善が望まれている。その理由の一つはマトリックスが炭水化物構造を有するゆえに機械的影響に対して感受性でありかつ微生物により攻撃されうることである。もう一つの理由はスルフヒドリル基の導入法が高価であるかまたは煩雑でありそして多くの場合に不安定な結合を生ずるからである。

10) ジスルフィドを用いる活性化後に、チオール基含有物質の結合のための請求項1記載のポリマー。

11) アルファ、 β -アンチトリブシンの精製のための請求項1記載のポリマーの使用。

3. 発明の詳細な説明

本発明はチオール基を含有するポリマー、その製法およびその使用に関する。

メルカプト基で誘導体形成されたポリマー担体物質は大変重要である、何故ならその物質により一方では通常スルフヒドリル基と相互作用する物質が精製され、他方では物質がスルフヒドリル基に不可逆的に固定されうることからである。かかる物質は例えば酵素、抗体、プロ酵素または抗原でありうる。担体マトリックスとしてはこれまで特にアガロースの誘導体がいわれてきた。これらポリマー担体の製造においてはスルフヒドリル官能基の化学的導入が特に注目

それゆえ、本発明の目的はチオール基を含有するポリマーを簡単にかつ経済的に製造しうる方法を開発することであった。その他に形成される化学的結合が高い安定性を有するという条件を満たす必要があった。

本発明の目的はまた、誘導体形成に用いられるマトリックスに起因して優れた機械的および化学的安定性を有するチオール基含有ポリマーを製造することであった。

今、驚くべきことに、オキシラン基で誘導体形成されたポリマーが硫化水素の水溶性塩と反応して固定されたスルフヒドリル官能基を形成することが見出された。

本発明はヒドロキシル基を含有する水不溶性ポリマー中にオキシラン基を導入しそしてオキシラン基を含有するポリマーを硫化水素の水溶性塩好ましくはアルカリ金属またはアルカリ土類金属塩で処理することにより得られるチオー

ル基含有ポリマーに関する。

ヒドロキシル基を含有するポリマーとしては炭水化物に基づくポリマー例えばアガロースゲルまたはデキストランゲルあるいはメタクリルアミド、N-メチレン-ビス-メタクリルアミド、グリシジルメタクリレート/ポリエチレングリコール誘導体およびペンタエリトリールジメタクリレートに基づくポリマーが適当である。

化学的性質が共重合体としての特徴を有し、アクリル酸またはメタクリル酸誘導体から構成されそしてオキシラン基を有するポリマーがチオール基含有ポリマーの製造に適する。かかる共重合体のモノマー成分の例をあげれば、メタクリルアミド、N-メチレン-ビス-メタクリルアミド、グリシジルメタクリレート、グリシジルメタクリレート/ポリエチレングリコール誘導体またはペンタエリトリール

は水性緩衝液中にとる。その場合通常樹脂1kg当り500ml〜3ℓ好ましくは約1ℓが添加される。緩衝液としては塩溶液例えばpH4〜13を有する磷酸ナトリウム緩衝液、クエン酸ナトリウム緩衝液またはヘブス緩衝液が用いられうる。好ましくはポリマー1kg当り0.25モル炭酸水素ナトリウム溶液1ℓが添加される。

次に水溶性硫化物または硫化水素化物、好ましくは硫化アルカリ金属の10〜200gを加える。特に好ましくは硫化ナトリウム×9H₂O 70〜80gを加え、そして反応混合物を0〜70℃好ましくは35〜45℃で攪拌する。反応時間としては2〜48時間、好ましくは12〜14時間が選択される。次にポリマーを水および/または0.5M/100ml酢酸で洗浄する。

本発明はまたヒドロキシル基を含有する水不溶性ポリマーを40〜50℃で1-クロロ-2,3-エポキシプロパン(エピクロロヒドリン)また

メタクリル酸誘導体である。特にフラクトゲル(Fractogel)またはセパビーズ(Sepabeads)なる名称の下に市販されている樹脂が適当である。

これら水不溶性樹脂のヒドロキシル基は知られた方法例えばEP-A-0,203,463号の記載に従い1-クロロ-2,3-エポキシプロパン(エピクロロヒドリン)または1,4-ビス-(2,3-エポキシプロポキシ)-ブタンと反応させて、それによりオキシラン基をポリマー中に導入する。

エポキシド化は、例えば水で温めたポリマー1kgを水1500mlおよび2N水酸化ナトリウム溶液650ml中に懸濁させそしてこの懸濁液を高められた温度例えば40〜50℃でエピクロロヒドリン200mlと反応させることにより行われる。1〜4時間後にポリマーを水洗しそして吸引乾燥する。

次にオキシランを含有するポリマーを水また

は1,4-ビス-(2,3-エポキシプロポキシ)-ブタンと1〜4時間反応させて、それによりオキシラン基をポリマー中に導入させ、ポリマーを水洗し、水溶液中にとり、0〜70℃で2〜48時間水溶性硫化物で処理しそしてポリマーを水または希酸で洗浄することからなるチオール基含有ポリマーの製法にも関する。

本発明による好ましいポリマーは、ペンタエリトリール、メタクリル酸誘導体およびポリエチレングリコールからなりかつジビニルベンゼンで架橋された共重合体をエピクロロヒドリンと反応させることによりこの共重合体中にオキシラン基を導入し、そして硫化ナトリウムで処理することにより得られうるポリマーである。

本発明によるさらに好ましいポリマーは、メタクリル酸誘導体(Sepabeads®)に基づくポリマーをブタンジオールジグリシジルエーテルと

反応させることによりこのポリマー中にオキシラン基を導入し、そして硫化ナトリウムで処理することにより得られうるポリマーである。

前記方法によりチオール官能基を備えたポリマー担体はそれらが機械的および化学的に安定であるゆえに酵素、プロ酵素、抗体または抗原の固定、ならびにメルカプト基と相互作用する物質のクロマトグラフィーに特に好ましくかつ適する。

さらに、かくして製造されたチオール含有ポリマーは予めジスルフィッドでの活性化後に、チオール基を含有する物質例えばタンパク質と反応してジスルフィッド交換させるのにも適する。それによりかかるタンパク質は濃縮せられるまたはポリマーから分離され、従って精製せられる。重合体状メルカプト基の活性化に特に適するジスルフィッドの例をあげれば、2,2'-ジビリジルジスルフィッド、ビス-(2-ビ

リジル-n-オキサイド)-ジスルフィッド、および5,5'-ジチオビス-(2-ニトロ安息酸)である。

本発明によるポリマーは α , ω -アンチトリブシンの精製に好都合に使用せられる。

以下の実施例により本発明を説明する。

実施例 1

フラクトゲル(Fractogel®)に基づくチオール含有ポリマーの製造

ペンタエリトリール、メタクリル酸誘導体およびポリエチレングリコールからなる共重合体フラクトゲルHW-65(F)(Toyo Soda社製)1000mlに水350mlおよび5N水酸化ナトリウム溶液275mlを加え、この混合物を45℃に加温した。これにエピクロロヒドリン200mlを加え、この温度で2時間攪拌した。この混合物を濾過し、そして洗液のpHが7となるまで水洗した。吸引乾燥した樹脂を0.2モルの炭酸水素ナトリウム

溶液1400ml中にとりそして $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$ 72gを加えた。この反応混合物を40℃で15時間攪拌し、吸引濾過し、そして水および次に0.5ml/100mlの酢酸で充分に洗浄した。

実施例 2

セバピーズ(Sepabeads®)(Mitsubishi社製)に基づくチオール含有ポリマーの製造

NaBH_4 2gを含有する0.6N NaOH 1000ml中にセバピーズ HG 05 1000mlを懸濁させた。次にこれにブタンジオールジグリシジルエーテル1000mlを加え、この懸濁液を室温で8時間攪拌した。エポキシ活性化されたセバピーズ HG 05物質をガラスフリット上、水15mlを用いて洗浄した。これを実施例1と同様にして $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$ と反応させた。

実施例 3

2,2'-ジチオビス-(ビリジーン-N-オキサイド)を用いるチオール含有フラクトゲルの活性

化

実施例1に記載されるようにして製造されたチオール含有フラクトゲルHW-65 500mlを、50ミリモル/lのトリス/HClおよび150ミリモル/lのNaClを含有するpH7.5の緩衝液Aで平衡とした。次にこの樹脂物質を緩衝液A+1.5ミリモル/lの2,2'-ジチオビス-(ビリジーン-N-オキサイド)1gずつと4回室温で320分間インキュベーションしそして次に再び緩衝液Aで洗浄した。かくして活性化された樹脂物質はここで例えばジスルフィッド交換反応に使用できる。

実施例 4

ジ-(2-ビリジル)ジスルフィッドを用いるチオール含有セバピーズHG 05の活性化

実施例2に記載されるようにして製造されたチオール含有セバピーズHG 05の500mlを実施例3に記載される条件下に1.5ミリモル/lのジ

-(2-ピリジル)-ジスルフィドを用いて活性化した。

実施例 5

α₁-アンチトリプシンの精製

ヒト血漿500mlを30ミリモル/lのメルカプトエタノールを含有する水1000mlで希釈し、室温で1時間インキュベーションしそして次に硫酸アンモニウムを用い50%(w/v)飽和と75%(w/v)飽和の間の分割沈殿にかけた。50-75%(w/v)残留物を50ミリモル/lのトリス、200ミリモル/lのNaClおよび1ミリモル/lのEDTAを含有するpH8.0の溶液中に溶解させ、そして500mlのACA® 202カラムでクロマトグラフィーした。α₁-アンチトリプシンを含有するフラクションを含しそして2,2'-ジチオビス-(ピリジン-N-オキシド)で活性化したチオール-フラクトゲルカラム(100ml)に加えた。このカラムを同じ緩衝液で洗いそしてα₁-アン

チトリプシンを10ミリモル/lのジチオトレイトールを含有する溶液を用いて溶離した。かくして得られたα₁-アンチトリプシンは実質上不純物を含有していなかった。

特許出願人 ベーリンググエルケ・アクチエン
ゲゼルシャフト

代理人 弁理士 高 木 千 重



外 2 名